

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2005-027569

(43)Date of publication of application : 03.02.2005

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
A61K 31/7088  
A61K 38/16  
A61K 48/00  
A61P 35/00  
C07H 21/04

(21)Application number : 2003-271192

(71)Applicant : NATIONAL INSTITUTE OF  
ADVANCED INDUSTRIAL &  
TECHNOLOGY  
UNIV KINKI  
KITAKYUSHU FOUNDATION FOR  
THE ADVANCEMENT OF INDUSTRY  
SCIENCE & TECHNOLOGY

(22)Date of filing : 04.07.2003

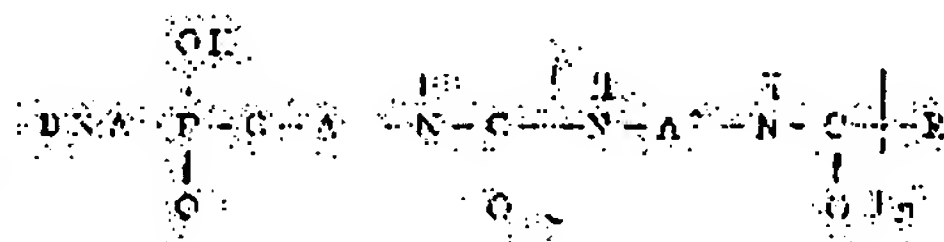
(72)Inventor : OBA HIDEKI  
BAKALOVA RUMIANA  
FUJII MASAYUKI

(54) NEW DNA CONJUGATE AND ANTISENSE AGENT WITH THE SAME AS ACTIVE  
INGREDIENT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new DNA  
conjugate producible by a simple method using an  
inexpensive raw material, exhibiting excellent antisense  
properties, and giving a double-stranded hybrid in  
between the conjugate and a complementary DNA in a  
stable condition.

SOLUTION: The new DNA conjugate is represented by  
the general formula( wherein, A1 is an alkylene group or  
an alkylene group interrupted by an oxygen atom; A2 is  
an alkylene group; R is a residue of a peptide, saccharide  
or functional amine; and n is 0 or 1 ).



(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-27569

(P2005-27569A)

(43) 公開日 平成17年2月3日(2005.2.3)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 N 15/09

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 38/18

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 35/00

F 1

C 1 2 N 15/00

A 6 1 K 31/7088

A 6 1 K 48/00

A 6 1 P 35/00

C O 7 H 21/04

Z N A A

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 C O 5 7

4 C O 8 4

4 C O 8 6

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2003-271192 (P2003-271192)

(22) 出願日

平成15年7月4日 (2003.7.4)

(71) 出願人 301021533

独立行政法人産業技術総合研究所

東京都千代田区霞が関1-3-1

(71) 出願人 000125347

学校法人近畿大学

大阪府東大阪市小若江3丁目4番1号

(71) 出願人 802000031

財団法人北九州産業学術推進機構

福岡県北九州市若松区ひびきの2番1号

(74) 代理人 100071825

弁理士 阿形 明

(72) 発明者 大庭 英樹

佐賀県鳥栖市宿町字野々下807番地1

独立行政法人産業技術総合研究所九州セン

ター内

最終頁に続く

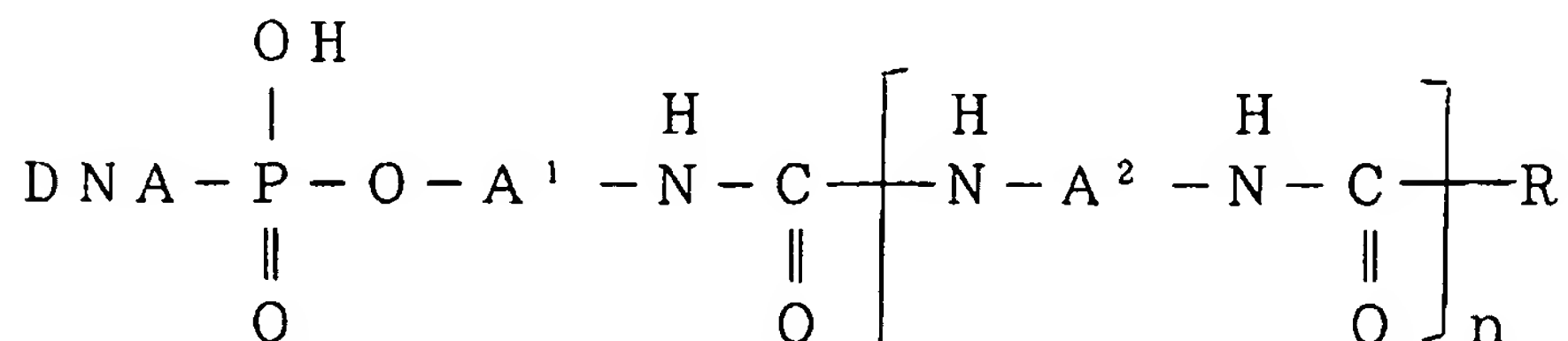
(54) 【発明の名称】 新規DNAコンジュゲート及びそれを有効成分とするアンチセンス剤

(57) 【要約】

【課題】 安価な原料を用い、簡単な方法で製造することができ、しかも優れたアンチセンス特性を示し、相補的なDNAとの間の2本鎖ハイブリッドを安定した状態で与える新規なDNAコンジュゲートを提供する。

【解決手段】 一般式

【化1】



(式中のA<sup>1</sup>はアルキレン基又は酸素原子で中断されたアルキレン基、A<sup>2</sup>はアルキレン基、Rはペプチド、糖又は機能性アミンの残基、nは0又は1である)

で表わされるDNAコンジュゲートとする。

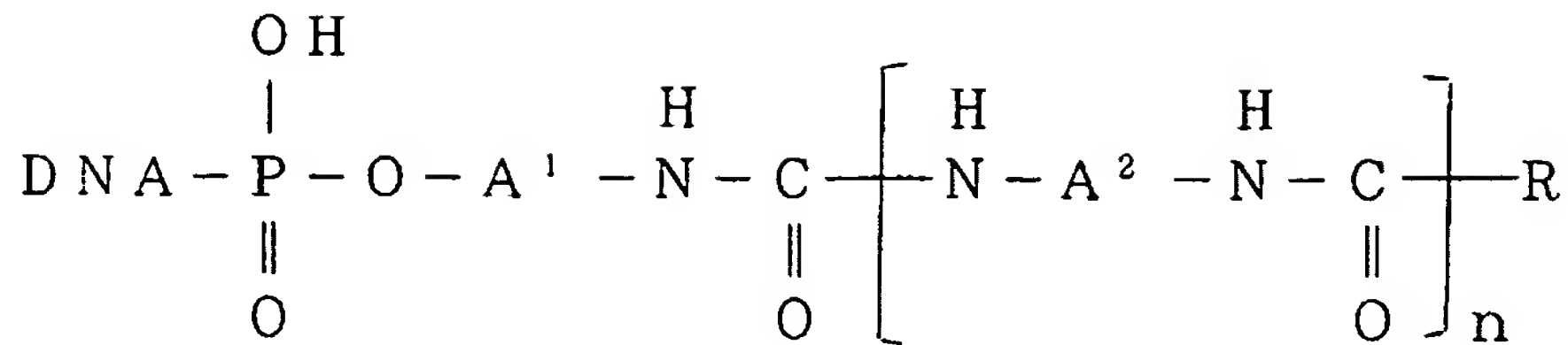
【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

一般式

## 【化1】



(式中のA<sup>1</sup>はアルキレン基又は酸素原子で中断されたアルキレン基、A<sup>2</sup>はアルキレン基、Rはペプチド、糖又は機能性アミンの残基、nは0又は1である)  
で表わされるDNAコンジュゲート。

## 【請求項2】

請求項1記載のDNAコンジュゲートを有効成分としてなるアンチセンス剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、アンチセンス活性を有する新規なDNAコンジュゲートに関するものである。

## 【背景技術】

## 【0002】

オリゴヌクレオチドとペプチドとの複合体は、遺伝子発現のアンチセンス剤として使用するためのポテンシャルを有し、そのペプチドにより活性オリゴヌクレオチドの細胞間濃度の増大を助長させるので、その形成のために多くの試みがなされている。

## 【0003】

例えば、合成オリゴヌクレオチドの5'-末端にチオール基を導入することにより、DNAとペプチドサイフォンとのコンジュゲートが得られている(非特許文献1参照)。そのほか、タンパク質分子中に存在するアミノ基、カルボン酸基、水酸基、フェノール基などの官能基を利用し、ジアルキル化試薬、ジマレイミド、ジアルデヒドなどの二官能性リンカーを介して機能性有機化合物、例えばアンジオテンシンI、インスリン、プラジキニン、トブラマイシン、その他の抗ガン性物質を複合させたものも知られ、また芳香族ジチオイソシアネートをリンカーとして用いることも提案されている(非特許文献2参照)。

## 【0004】

しかしながら、これらのオリゴヌクレオチドとペプチドとの複合体は、その製造において必要な原料のコストが高い上に、製造過程も煩雑で、収率が低く、しかもアンチセンス特性も不十分であるため、実用的には必ずしも満足できるものではなかった。

## 【0005】

【非特許文献1】「バイオコンジュゲート・ケミストリー(Bioconjugate Chemistry)」、1994年、第5巻、p. 373-378

【非特許文献2】「サイエンス(Science)」、1964年、第144巻、p. 1344

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0006】

本発明は、安価な原料を用い、簡単な方法で製造することができ、しかも優れたアンチセンス特性を示し、相補的なDNAとの間の2本鎖ハイブリッドを安定した状態で与える新規なDNAコンジュゲートを提供することを目的となされたものである。

【課題を解決するための手段】

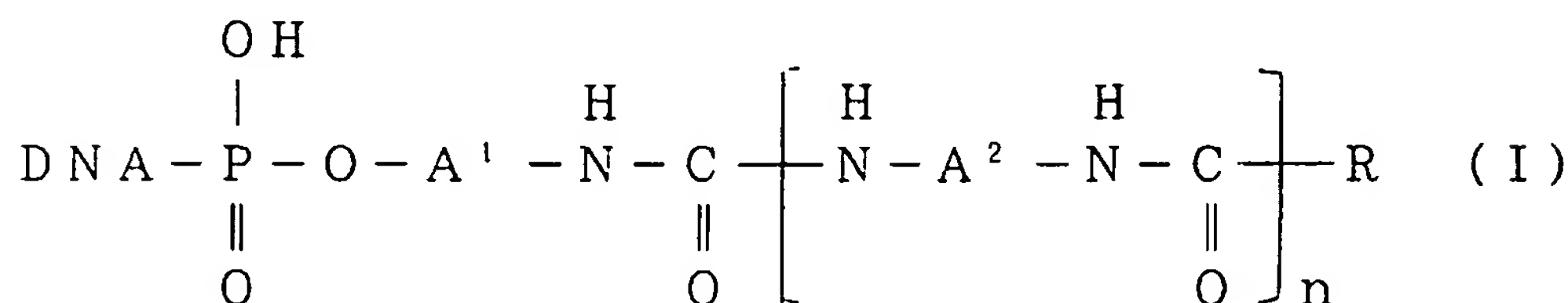
【0007】

本発明者らは、新規なDNAコンジュゲートを開発するために鋭意研究を重ねた結果、固相フラグメント縮合法を用い、末端水酸基をもつDNAに $\omega$ -アミノアルキルホスホロエート及び脂肪族ジイソシアネート又はカルボニルジイミダゾールをリンカー形成剤としてペプチド、糖又は機能性アミンを縮合させることにより、優れたアンチセンス特性を示し、相補的なDNAとの間で安定した2本鎖ハイブリッドを形成するDNAコンジュゲートが高収率で得られることを見出し、この知見に基づいて本発明をなすに至った。

【0008】

すなわち、本発明は、一般式

【化1】



(式中のA<sup>1</sup>はアルキレン基又は酸素原子で中断されたアルキレン基、A<sup>2</sup>はアルキレン基、Rはペプチド、糖又は機能性アミンの残基、nは0又は1である)

で表わされるDNAコンジュゲート、及びそれを有効成分としてなるアンチセンス剤を提供するものである。

【0009】

前記の一般式(I)におけるDNAについては、特に制限はなく、各種動物細胞由来のDNA、各種細菌類由来のDNAあるいはそれらを酵素で細断して得られるDNAセグメントなどの中から、その使用目的に応じ任意に選んで使用することができるが、本発明においては、5'-末端水酸基にアミノ化剤を反応させてアミノ基を導入したものを用いることが必要である。

【0010】

次に、一般式(I)中のA<sup>1</sup>結合のアルキレン基としては、炭素数2~10、好ましくは4~8のポリメチレン基、例えばエチレン基、プロピレン基、ブチレン基、ペンチレン基、ヘキシレン基などを挙げることができる。このアルキレン基は、炭素鎖が酸素原子で中断されたもの、例えば2-オキサプロピレン基、3-オキサペンチレン基、4-オキサヘプチレン基などであってもよい。

また、一般式(I)中のA<sup>2</sup>結合のアルキレン基としては、炭素数4~12のポリメチレン基又は分枝状アルキレン基が好ましい。

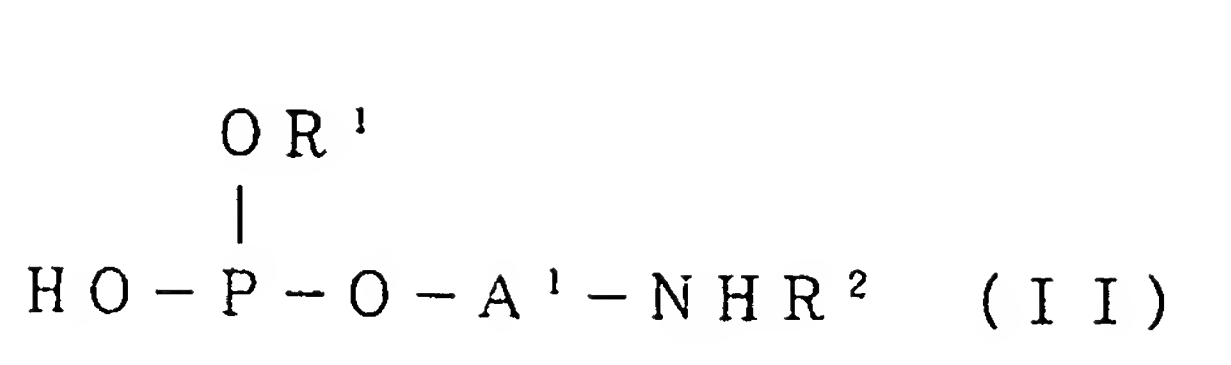
【0011】

そして、前記のDNAにリンカーを介して導入されるペプチドとしては、各種タンパク質の分解により得られるペプチド、例えば核外輸送シグナルペプチド、抗原由来の核局在化シグナルペプチド、合成された両親媒性 $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -シートペプチドなどを、糖類としては、ショ糖、ガラクトサミンなどを、また機能性アミンとしては、スベルミン、リポフェクトアミンなどを挙げることができる。

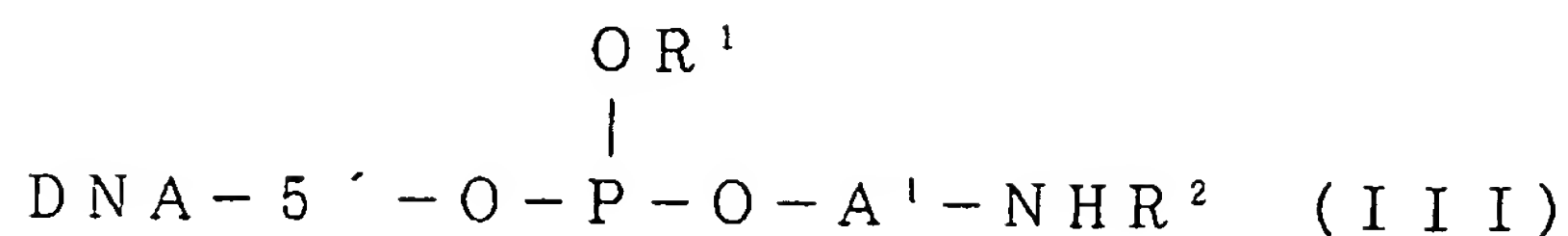
【0012】

本発明のDNAコンジュゲートのうち、一般式(I)において、n=1のものは、固相フラグメント縮合法に従い、固相担体例えば多孔性ガラス、制御多孔性ガラス(CPG)、ポリエチレングリコール-ポリスチレンなどに、DNA例えば5'-末端に水酸基をもつオリゴヌクレオチドを縮合させたのち、触媒の存在下、一般式

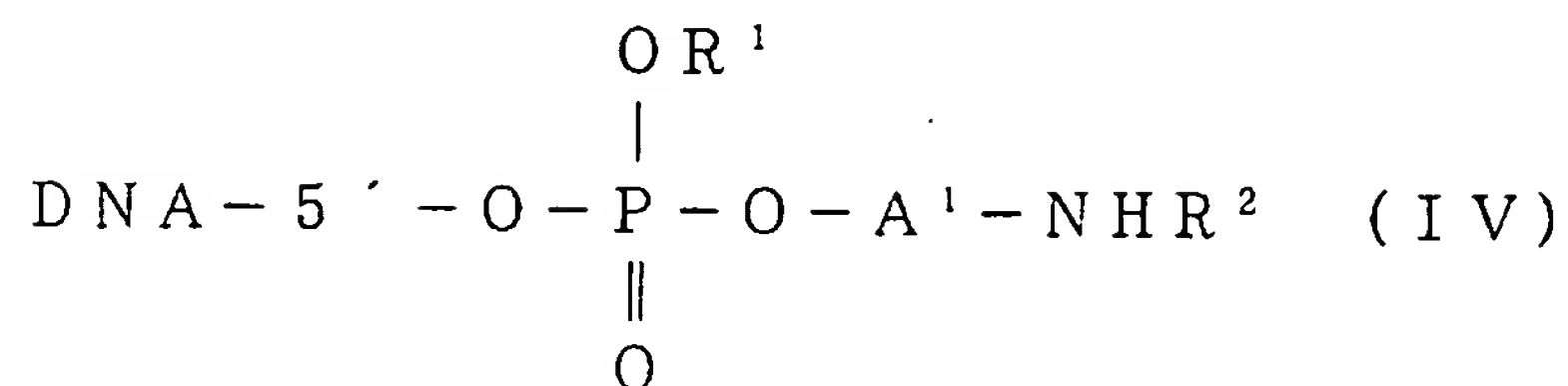
【化2】



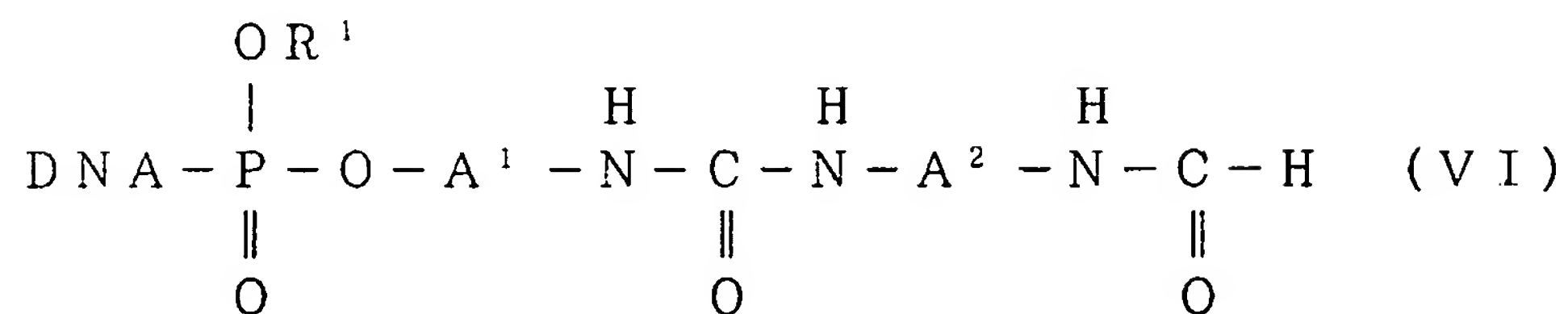
【化3】



【化4】



【化5】

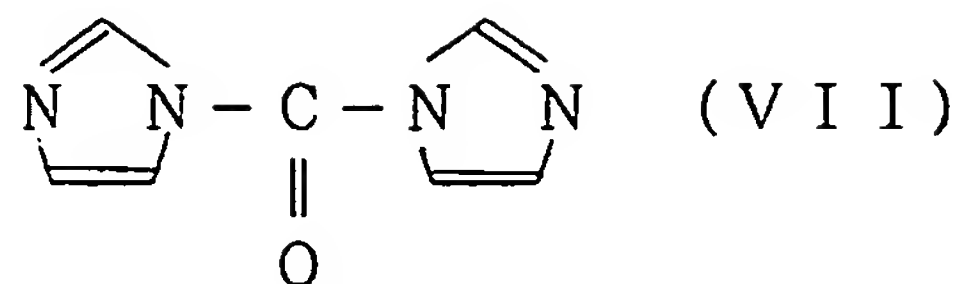


(式中のR<sup>1</sup>、A<sup>1</sup>及びA<sup>2</sup>は前記と同じ意味をもつ)  
 で表わされる化合物を製造したのち、これにペプチド、糖又は機能性アミンを反応させ、  
 最後にアルカリ例えばアンモニア水で処理して固相担体からの切りはなし、及び保護基の  
 脱離を行うことにより製造することができる(以下合成法1という)。

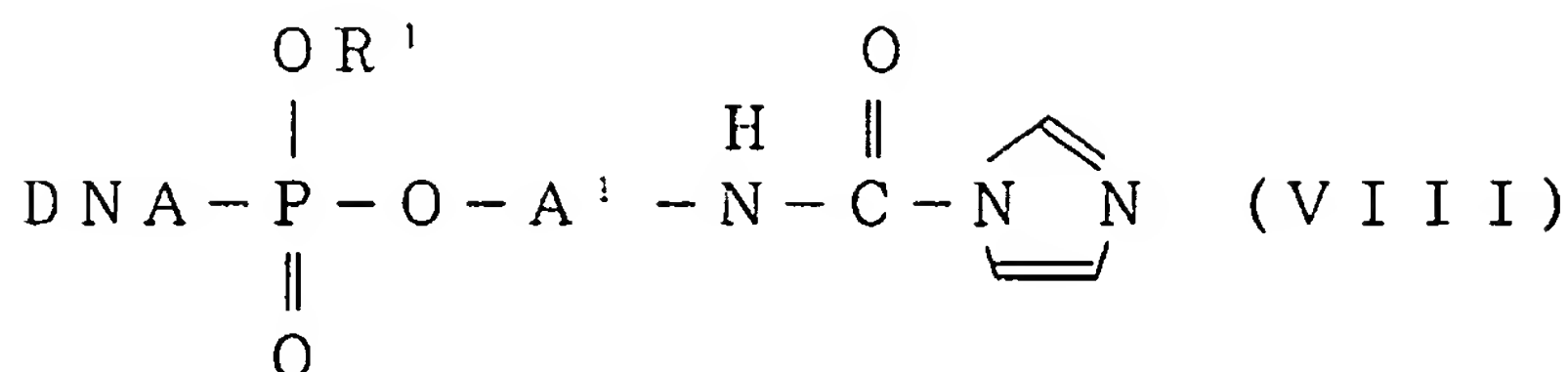
【0013】

一方、一般式(I)において、n=0のものは、前記一般式(V)で表わされる脂肪族  
 ジイソシアネートの代りに、式

【化6】



【化7】

(式中のR<sup>1</sup>、A<sup>1</sup>は前記と同じ意味をもつ)

で表わされる化合物を製造したのち、これにペプチド、糖又は機能性アミンを反応させ、さらにアルカリ処理することにより製造することができる(以下合成法2という)。

これらの反応は、適当な溶媒、例えばアセトニトリル、ジメチルホルムアミドなどを用いて行われる。

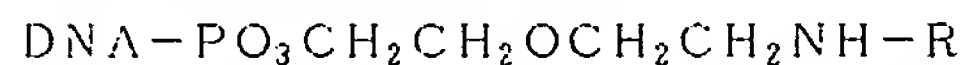
【0014】

次いで、このようにして得た反応生成物にアンモニア水を加え、固体担体からDNAコンジュゲートを切り出すとともに、場合により存在するペプチドの保護基の脱離を行う。

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>で示される保護基としては、例えば2-シアノエチル基のようなω-シアノアルキル基や、4-メトキシフェニルジフェニルメチル基のようなトリフェニルメチル誘導体残基が用いられる。

【0015】

このようにして得られる一般式



で表わされる本発明のDNAコンジュゲートの例としては、DNA及びRが以下の表1に示す構造をもつCI～CXIを挙げることができる。

【0016】

【表1】

DNA コンジュゲート	DNA	R
CI	3'-tctctctctctttt	AsnSerAlaAlaPheGluAspLeuArgValLeuSer-OH
CII	3'-tctctctctctttt	AlaLeuProProLeuGluArgLeuThrLeu-OH
CIII	3'-tctctctctctttt	LeuArgAlaLeuLeuArgAlaLeuLeuArgAlaLeu-OH
CIV	3'-tctctctctctttt	ArgLeuArgLeuArgLeuArgLeuArgLeu-OH
CV	3'-tctctctctctttt	D-ガラクトサミン残基
CVI	3'-cagttagggttag	スペルミン残基
CVII	3'-cagttagggttag	AsnSerAlaAlaPheGluAspLeuArgValLeuSer-OH
CVIII	3'-cagttagggttag	AlaLeuProProLeuGluArgLeuThrLeu-OH
CIX	3'-cagttagggttag	ArgLeuArgLeuArgLeuArgLeuArgLeuArgLeuArg-OH
CX	3'-cagttagggttag	D-ガラクトース残基
CXI	3'-cagttagggttag	スペルミン残基

【0017】

また、一般式



で表わされる本発明のDNAコンジュゲートの例としてはDNA及びRが以下の表2に示す構造をもつCXII～CXVIを挙げることができる。

【0018】

【表2】

DNA コンジュゲート	DNA	R
CXII	3'-tctctctctctttt	ProLysLysLysArgLysLysVal-OH
CXIII	3'-cagttagggttag	ProLysLysLysArgLysVal-OH
CXIV	3'-cagttagggttag	GlyArgLysLysArgArgGlnArgArgArgProProGlnGlnGys-OH
CXV	3'-cagttagggttag	LeuArgAlaLeuLeuArgAlaLeuLeuArgAlaLeu-OH
CXVI	3'-cagttagggttag	ProLysLysLysArgLysVal-OH

【発明の効果】

【0019】

本発明によると、簡単な反応操作により、優れたアンチセンス特性をもち、相補的なDNAとの間で安定した2本鎖ハイブリッドを形成しうる、アンチセンス剤として好適なDNAコンジュゲートを製造することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

次に、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

【実施例】

【0021】

先ずDNA自動合成機（クルアケム（Cruachem）社製、製品名「PS250」）を用い、制御多孔性ガラス（グレンリサーチ社製、製品名「500Åサポート」、以下CPGと略す）に、5'末端の水酸基をジメトキシトリチル基で保護したオリゴヌクレオチドNI（ttttttctctctctct-3'）を担持させたのち、トリクロロ酢酸の3質量%アセトニトリル溶液で処理して、その保護基を脱離し、その遊離水酸基に市販のアミノ化試薬であるN-メトキシトリチル-2-(2-アミノエチルオキシ)エチルホスホアミダイトを1Hテトラゾールを含むジメチルホルムアミド溶液により室温下、30分間反応させることによりアミノ化した。

【0022】

次いで未反応の5'-水酸基を無水酢酸によりキャッピングしたのち、ヨウ素酢酸溶液によりリン原子部分を酸化してリン酸エステルを形成させた。このようにして得た中間体化合物にトリクロロ酢酸の3質量%アセトニトリル溶液を反応させて末端アミノ基の保護基であるメトキシトリチル基を除去し、次にヘキサメチレンジイソシアネート（HMI）又はカルボニルジイミダゾール（CDI）とジイソプロピルエチルアミンを含むジメチルホルムアミド中、室温下2～12時間反応させたのち、表3に示すペプチド又はガラクトサミンをジイソプロピルエチルアミンを含むジメチルホルムアミド中、室温下24時間反応させた。

【0023】

次に、このようにして得た反応生成物を濃アンモニア水中、55℃において4時間処理することにより、CPGからの切り出しとオリゴヌクレオチド及びペプチドに結合している保護基の除去を行い、所望のDNAコンジュゲートを粗製物として得た。

この粗製物を逆相液体クロマトグラフを用いて精製し、得られた化合物を液体クロマトグラフ及びレーザー励起飛行時間型質量スペクトル分析（MALDI-TOF MS）により分析した。その結果を表3に示す。

【0024】



【表3】

試料 No.	ペプチド又は糖	リンカー	収率 (wt%)	TOF-MS
1	ProLysLysLysArgLysVal	HMI	6.50	5637.77
2	AsnSerAlaAlaPheGluAspLeuArgValLeuSer	CDI	10.66	6003.97
3	AlaLeuProProLeuGluArgLeuThrLeu	CDI	10.68	5799.53
4	LeuArgAlaLeuLeuArgAlaLeuLeuArgAlaLeu	CDI	10.62	6064.46
5	ArgLeuArgLeuArgLeuArgLeuArgLeu	CDI	15.69	6051.81
6	ガラクトサミン	CDI	27.04	5932.67

【実施例】

【0025】

実施例1におけるオリゴヌクレオチドNI (ttttttctctctctct-3')  
の代りに、オリゴヌクレオチドNII (5'-cagttagggttag-3')又は  
オリゴヌクレオチドSI (5'-cagttagggttag-3')を用い、表3に示  
すペプチド又はアミンと実施例1と同様にして結合させ、DNAコンジュゲート試料7～  
15を製造した。その結果を表4に示す。

【0026】

【表4】

試料 No.	DNA	ペプチド又はアミン	リンカー	収率 (wt%)	TOF-MS
7	NII	スperlミン	CDI	19.20	4419.74
8	NII	ProLysLysLysArgLysVal	HMI	21.53	5505.97
9	NII	GlyArgLysLysArgArgGlnArgArgArgProProGlnCys	HMI	10.70	6303.02
10	NII	AsnSerAlaAlaPheGluAspLeuArgValLeuSer	CDI	7.25	5602.72
11	NII	AlaLeuProProLeuGluArgLeuThrLeu	CDI	2.65	5614.30
12	NII	LeuArgAlaLeuLeuArgAlaLeuLeuArgAlaLeu	HMI	5.42	5815.13
13	NII	ArgLeuArgLeuArgLeuArgLeuArgLeuArgLeuArg	CDI	1.41	6082.87
14	SI	スperlミン	CDI	14.94	4610.01
15	SI	ProLysLysLysArgLysVal	HMI	3.94	5593.11

【実施例】

【0027】

実施例1におけるオリゴヌクレオチドNI (ttttttctctctctct-3')  
の代りに、オリゴヌクレオチドRI [5'-r-(agagagagagaaaa)-  
を用い、これに実施例1で用いたペプチド又は糖を実施例1と同様にして反応させることに  
より、表5に示すDNAコンジュゲート試料16～21を製造した。

【0028】

【表5】

試料 No.	DNA	ペプチド又は糖
16	RI	ProLysLysLysArgLysVal
17	RI	AsnSerAlaAlaPheGluAspLeuArgValLeuSer
18	RI	AlaLeuProProLeuGluArgLeuThrLeu
19	RI	LeuArgAlaLeuLeuArgAlaLeuLeuArgAlaLeu
20	RI	ArgLeuArgLeuArgLeuArgLeuArgLeuArgLeu
21	RI	ガラクトサミン

【実施例】

【0029】

実施例1及び3で得たDNAコンジュゲート試料No. 1～6及びNo. 16～21に  
ついて、それらの相補鎖DNAとの安定性を次のようにして試験した。



UV検出器（日本分光社製、製品名「V-560UV/Visスペクトロメータ」）を用い、100mM NaCl、50mM Tris-HCl、20mM MgCl<sub>2</sub>からなる緩衝溶液（pH7.0）中に各試料を1μM濃度で溶解し、これに相補鎖DNAを加え、92℃で5分間加熱することにより、いったん2本鎖を融解したのち、4℃まで徐冷して2本鎖を再結合させた。

次いで、これを5℃から80℃まで0.5℃/分の上昇速度で加熱し、UV検出器により260nmにおける吸光度変化を測定し、50%吸光度上昇地点の温度を融解温度として算出した。その結果を表6に示す。

なお、表中の+Mgは測定溶液にMgCl<sub>2</sub>が存在する場合、-MgはMgCl<sub>2</sub>が存在しない場合を示す。

【0030】

【表6】

試料 No.	T <sub>m</sub> (°C)		ΔT <sub>m</sub> (°C)	
	+Mg <sup>2+</sup>	-Mg <sup>2+</sup>	+Mg <sup>2+</sup>	-Mg <sup>2+</sup>
1	50.00	46.53	+0.47	+2.70
2	48.75	42.59	-0.78	-1.24
3	49.25	39.75	-0.28	-4.08
4	52.90	45.25	+3.37	+1.42
5	59.50	52.25	+9.97	+8.42
6	49.28	43.41	-0.25	-0.42
16	52.77	47.51	+2.53	+3.20
17	50.49	43.78	+0.25	-0.53
18	49.64	45.17	-0.60	+0.86
19	48.77	46.09	-1.47	+1.78
20	49.80	48.16	-0.44	+3.85
21	52.80	47.01	+3.00	+1.15

【0031】

この表から、本発明のDNAコンジュゲート分子は、相補的なDNAとの間でハイブリッド2本鎖を形成しうること、相補的なDNAとの間のハイブリッドの融解温度は、カチオン性アミノ酸であるLysやArgの含有割合が多いペプチドをコンジュゲートした試料No. 1、No. 4、No. 5、No. 16及び糖をコンジュゲートした試料No. 21で上昇し、2本鎖を安定化すること、特に合成のβ-シートペプチドをコンジュゲートしたものは、ハイブリッド2本鎖を著しく安定化させること、疎水性アミノ酸を多く含むペプチドをコンジュゲートした試料No. 3、No. 18は、相補的なDNAとの間のハイブリッド2本鎖の安定化の上昇は認められないが、不安定にはならないことなどが分る。

【実施例】

【0032】

本発明のDNAコンジュゲートのDNA分解酵素DNアーゼ1に対する耐性試験を以下のようにして行った。

実施例1で得た試料No. 1を0.1M NaClで濃度1μMに調整し、この中に160Kunitz単位のDNアーゼ1（シグマ社製）5mlを加え、37℃に保持して、経時的にその分解率を測定したところ、120分間における分解率は20%であった。

また、比較のために行った天然DNAにおける分解率は100%であった。

なお、1Kunitzは25℃、pH5.0において1ml中のDNAについて、UVスペクトル260nmの吸光度を1分間で0.001上昇させる単位である。

【実施例】

【0033】

実施例1で得た試料No. 2及びNo. 4のDNAコンジュゲートについて、リボヌクレアーゼHに対する分解試験を以下のようにして行った。

試料と相補的なRNAの5'末端を蛍光ラベルしたものを10 $\mu$ M濃度に調整し、ハイブリッド2本鎖を形成させたのち、リボヌクレアーゼH（シグマ・アルドリッチ社製）2.5単位を加え、反応緩衝液中におけるRNAの分解率を20%ポリアクリルアミドゲル電気泳動で経時的に測定した。その結果、試料No. 2及びNo. 4は天然DNAとほぼ同様の活性を示すことが分った。

【実施例】

【0034】

実施例1で得た試料No. 2及びNo. 6のDNAコンジュゲートについて血清中での安定性を以下のようにして測定した。

各試料を120 $\mu$ lの超純水に1nM濃度で溶かし、10%の非動化済みウシ胎児血清20 $\mu$ lを加え、RP-HPLCを用いて、DNAの分解状態を経時的にモニターした。各時間ごとの反応停止は、試料を0.1M Tris-HCl、0.09Mホウ酸、7M尿素からなる反応溶液（pH8.4）中に加え、液体窒素を用いて凍結することによって行った。

モニターは、RP-HPLC（ヒューレッターパッカード社製、シリーズ1100）とODSカラム（5 $\times$ 125 $\times$ 4mm）を用い、260nmにおける変化を測定することによって行った。その結果、天然DNAは180分後に95%以上分解したのに対し、試料No. 2は35%、試料No. 6は28%の分解にとどまることが分った。

【実施例】

【0035】

実施例2及び3で得たDNAコンジュゲートについて細胞抽出液中でのヒトテロメラーゼ阻害活性を次のようにして測定した。このヒトテロメラーゼはガン細胞中に特異的に発現し、細胞の不死化を引き起す酵素である。

白血病細胞由来のジャーカット（Jurkat）からリシス（Lysis）溶液で抽出した液を用い、DNAコンジュゲートによりその活性が阻害される効果を、50%阻害に要する濃度（IC<sub>50</sub>）で表わした。その結果を表7に示す。

【0036】

【表7】

試料 No.	IC <sub>50</sub> (nM)
天然DNA(NII)	>400
8	15
9	65
11	120
14	60
15	70

【0037】

この表から分るように、本発明のDNAコンジュゲートは、天然DNAに比べて、より強いヒトテロメラーゼ阻害活性を示す。

【産業上の利用可能性】

【0038】

本発明のDNAコンジュゲートは、優れたアンチセンス特性を有し、相補的なDNAと安定なハイブリッド2本鎖を形成しうるので、アンチセンス剤として利用することができる。

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

C 0 7 H 21/04

F I

A 6 1 K 37/10

テーマコード(参考)

(72)発明者 ルミアナ バカロヴァ

佐賀県鳥栖市宿町字野々下 8 0 7 番地 1 独立行政法人産業技術総合研究所九州センター内

(72)発明者 藤井 政幸

福岡県飯塚市柏の森 1 1 - 6 近畿大学九州工学部内

ドターム(参考) 4B024 AA01 AA20 BA80 CA01 HA17

4C057 BB02 DD01 LL29 MM04 MM05 MM06 MM09

4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA17 BA18 BA35 CA59 DC50

NA10 ZB262

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA10 ZB26